

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
4. September 2003 (04.09.2003)

PCT

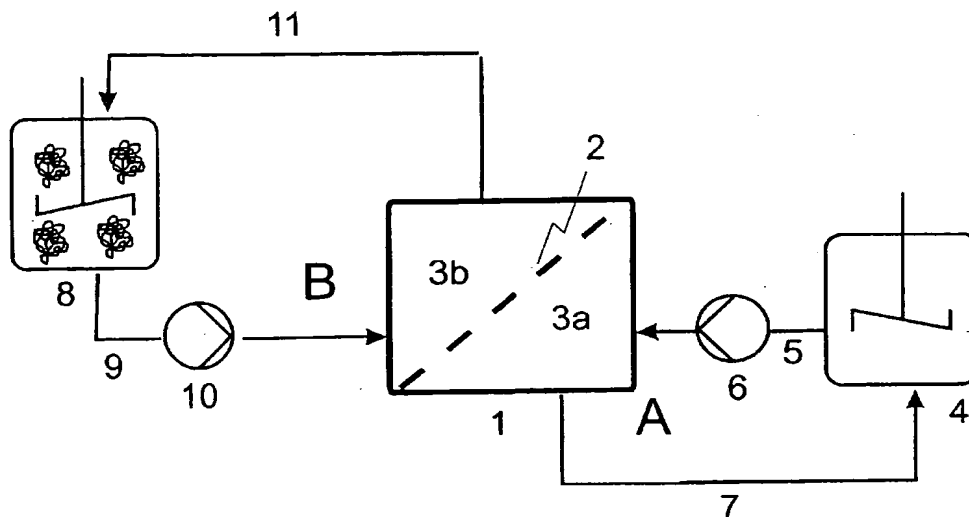
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/072793 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12P 7/02 (72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WANDREY, Christian
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE03/00518 [DE/DE]; Wolfshovener Str. 139, 52428 Jülich (DE). VIL-
LELA-FILHO, Maurillo de Oliveira [BR/DE]; Peterstr.
(22) Internationales Anmeldedatum: 15. Februar 2003 (15.02.2003) 6, 53111 Bonn (DE). LIESE, Andreas [DE/DE]; Brock-
müllerstrasse 15, 52428 Jülich (DE). HUMMEL, Werner
[DE/DE]; Claudiusstr. 11, 52445 Titz (DE).
(25) Einreichungssprache: Deutsch (74) Gemeinsamer Vertreter: FORSCHUNGSZENTRUM
JÜLICH GMBH; Fachbereich Patente, 52425 Jülich
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (DE).
(30) Angaben zur Priorität: 102 08 007.0 26. Februar 2002 (26.02.2002) DE (81) Bestimmungsstaat (national): US.
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,
von US): FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,
[DE/DE]; Wilhelm-Johnen-Strasse, 52425 Jülich (DE). HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING ALCOHOLS FROM SUBSTRATES BY USING OXIDE REDUCTASES, TWO-PHASE SYSTEM COMPRISING AN AQUEOUS PHASE AND AN ORGANIC PHASE AND DEVICE FOR CARRYING OUT SAID METHOD

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON ALKOHOLEN AUS SUBSTRATEN MITTELS OXIDOREDUKTASEN, ZWEIFHASSENSYSTEM UMFASSEND EINE WÄSSRIGE PHASE UND EINE ORGANISCHE PHASE SOWIE VORRICHTUNG ZUR DURCHFÜHRUNG DES VERFAHRENS



(57) Abstract: The invention relates to a method for producing alcohols from substrates by using oxide reductases, to a two-phase system comprising an aqueous phase and an organic phase and to a device for carrying out said method. The method for producing alcohols from substrates using oxide reductases is characterized by making an oxide reductase of microbial origin available in an aqueous solution and the substrate in an organic solution and by contacting the aqueous phase and the organic phase in a two-phase system. Surprisingly, said method leads to enzyme activities that last approximately 1000 hours. The inventive method allows the spatial decoupling of enzymatic reaction and cofactor regeneration, thereby increasing the effectivity of the reaction process.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 03/072793 A2

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Alkoholen aus Substraten mittels Oxidoreduktasen, Zweiphasensystem umfassend eine wässrige Phase und eine organische Phase sowie Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens. Erfindungsgemäß ist das Verfahren zur Herstellung von Alkoholen aus Substraten mittels Oxidoreduktasen dadurch gekennzeichnet, dass eine Oxidoreduktase mikrobieller Herkunft in wässriger Lösung und das Substrat in einer organischen Lösung vorgelegt werden und dass die wässrige Phase und die organische Phase in einem Zweiphasensystem miteinander in Kontakt gebracht werden. Überraschenderweise können mit diesem Verfahren Enzymaktivitäten einer Dauer von ca. 1000 Stunden beobachtet werden. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können die enzymatische Reaktion und die Cofaktorregenerierung räumlich entkoppelt werden. Hierdurch kann die Effektivität des Reaktionsprozesses gesteigert werden.

B e s c h r e i b u n g

Verfahren zur Herstellung von Alkoholen aus Substraten mittels Oxidoreduktasen, Zweiphasensystem umfassend eine wässrige Phase und eine organische Phase sowie Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Alkoholen aus Substraten mittels Oxidoreduktasen, ein Zweiphasensystem umfassend eine wässrige Phase und eine organische Phase sowie eine für die Durchführung des Verfahrens geeignete Vorrichtung.

Chirale oder achirale Alkohole können nach dem Stand der Technik durch Reduktion von Substraten mittels Oxidoreduktasen hergestellt werden. Beispielhaft kann die Reduktion prochiraler Ketone mittels Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (LBADH) genannt werden. Bei der enzymatischen Herstellung von Alkoholen treten immer wieder Probleme auf, so dass bei den bekannten Verfahren regelmäßig Verbesserungsbedarf besteht. So ist zum Beispiel die Löslichkeit von Ketonen begrenzt, welche häufig als Substrat für die enzymatische Gewinnung des Alkohols dienen. Zur Überwindung dieses Problems werden häufig Löslichkeitsvermittler, wie in Zelinski, T. „Enantioselektive Reduktion von Ketonen mit neuen NAD(H)-abhängigen Oxidoreduktasen“, Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades Heinrich Heine Universität Düsseldorf 1995 sowie in Zelinski, T. Liese A.; Wandrey, C; Kula, M.-R., „Asymmetric reductions in aqueous media: enzymatic synthesis in cyclodextrin containing buffers“ Tetrahedron Asymmetry 10, 1999, 1681-1687 dargestellt wurde, eingesetzt, die jedoch die enzymatische Reaktion stören können

und die nach deren Gebrauch aus dem Reaktionsgemisch oder aus dem Endprodukt entfernt werden müssen. Weiterhin können die Löslichkeitsvermittler in die enzymatische Aktivität der Oxidoreduktase eingreifen, deren Lebensdauer verkürzen bzw. deren Aktivität mindern. Einige Substrate sind ihrerseits in der wässrigen Phase instabil, so dass es bei der Reaktion zu Verlusten von Ausgangsstoffen kommt, die sich durch Konkurrenzreaktionen, beispielsweise mit dem Wasser als Lösungsmittel, der Hauptreaktion entziehen.

In einem anderen Verfahren wird das Enzym in einer wässrigen Phase vorgelegt, das Substrat in einem organischen Lösungsmittel, das in Wasser löslich ist, aufgelöst und zudosiert (Wolberg, M; Hummel, W; Müller, M, Biocatalytic Reduction of β, δ -Diketo Esters: A Highly Stereoselective Approach to All Four Stereoisomers of a Chlorinated β, δ -Dihydroxy Hexanoate, Chemistry-A European Journal 7 (21), 2001, 4562-4571). Erst bei Verbrauch des Substrates in der wässrigen Lösung wird die organische Lösung mit weiterem Substrat zudosiert. Hierbei dient die organische Phase als inertes Reservoir für die organische Verbindung. Es kommt dabei zu einer Erhöhung der Konzentration von organischen Lösungsmitteln in der wässrigen Phase, welche ihrerseits die Enzyme deaktivieren oder zumindest teilweise in ihrer Aktivität einschränken bzw. inhibieren kann. Weiterhin können sich Emulsionen ausbilden, deren Kontaktfläche nicht definiert ist und die sich im Verlauf der Umsetzung ändern kann, was Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit hat. Es hat sich gezeigt, dass an den Phasengrenzflächen zwischen wässriger Phase und organischer Phase eine Enzymdesaktivierung zu beobachten ist. Die Verwendung von Zweiphasensystemen für die enzymatische Umsetzung von Substraten zu Alkoholen führt daher

auch zu begrenzten Lebensdauern der eingesetzten Oxidoreduktasen, die bis zu 38 Stunden liegen können. Die Veröffentlichung „Efficient Repeated Use of Alcohol Dehydrogenase with NAD⁺ Regeneration in an Aqueous-organic Two-phase System“ in der Zeitschrift Biocatalysis and Biotransformation, 2002. Vol.20(1), pp. 23-28, offenbart die Umwandlung von Zimtalkohol in Zimtaldehyd in einem wässrig-organischen Zweiphasensystem mittels Pferdeleber-Alkoholdehydrogenase. Die Substratkonzentration in der wässrigen Phase wird durch den Verteilungskoeffizienten geregelt und konstant gehalten. Die Pferdeleber-Alkoholdehydrogenase zeigt jedoch nach 38 Stunden keine Aktivität mehr.

Weiterhin wurden verschiedene reaktionstechnische Konzepte entwickelt, bei denen Enzym und Substrat mit dafür vorgesehenen Vorrichtungen in einen bestimmten Reaktionsprozess geführt werden. Diese reaktionstechnischen Problemlösungen, wie sie beispielsweise in DE 44 36 149 A1 offenbart sind, sind jedoch nur für große Produktionsmengen mit hoher Wertschöpfung gerechtfertigt und daher nicht für den Laborbetrieb geeignet. Auch die Wirtschaftlichkeit ist erst bei großen Produktionsmengen gegeben.

Es ist daher die Aufgabe der Erfindung ein Verfahren, ein Stoffsystem und eine Vorrichtung zu schaffen, mit denen Alkohole durch enzymatische Reaktionen mittels Oxidoreduktasen unter Beibehaltung einer länger andauernden Enzymaktivität hergestellt werden können. Das Verfahren soll einfach und wirtschaftlich sein. Insbesondere soll eine einfache enantioselektive Synthese ermöglicht werden.

Ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 1 wird die Aufgabe überraschenderweise gelöst, mit dem im gekennzeichneten Teil des Anspruchs 1 angegebenen Merkmalen.

5 Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren wird eine hohe Enzymaktivität über einen langen Zeitraum von bis über 800 bis 1000 Stunden aufrechterhalten. Die Anwendung der erfindungsgemäßen Verfahrensweise ermöglicht eine örtliche Entkopplung der Cofaktor-Regenerierung für die enzymatische Reaktion von der Umsetzung des Substrats zu einem Alkohol.

Vorteilhafte Weiterbildungen der Erfindung sind in den Unteransprüchen angegeben.

15 Im folgenden soll die Erfindung detailliert erläutert werden.

Die Figuren zeigen Versuchsergebnisse sowie eine für die Durchführung des Verfahrens geeignete Vorrichtung.

Es zeigt:

Fig.1.: Eine erfindungsgemäße Vorrichtung

25 Fig.2.: Verlauf einer *LBADH*-katalysierten enantioselektiven Reduktion von Acetophenon zu Phenylethanol.

Fig.3.: Verlauf einer *LBADH*-katalysierten Reduktion von *tert*-Butyl-6-chloro-3,5-dioxohexanoat zu *tert*-Butyl (*S*)-6-chloro-5-hydroxy-3-oxohexanoat im Satzreaktorversuch.

30 Fig.4.: Verlauf einer *LBADH*-katalysierten enantioselektiven Reduktion von Acetophenon. Im wiederholten Satzversuch (repetitive Batch)

Fig.5.: Verlauf einer LBADH-katalysierten enantioselektiven Reduktion von tert-Butyl-6-Chloro-3,5-Dioxohexanoat zu tert-Butyl (S)-6-chloro-5-hydroxy-3-oxohexanoat im wiederholten Satzversuch (repetitive Batch)

Fig.6.: Verlauf einer LBADH-katalysierten enantioselektiven Reduktion von Acetophenon im Phasenkontaktor

Fig.7: Verlauf einer LBADH-katalysierten enantioselektiven Reduktion von von tert-Butyl-6-chloro-3,5-dioxohexanoat zu tert-Butyl (S)-6-chloro-5-hydroxy-3-oxohexanoat im Phasenkontaktor

Fig.8: Produktselektivität der Reaktion gemäß Figur 7 als Funktion des Umsatzes

Fig.9: Stabilität von LBADH im MTBE-Wasser Zweiphasensystem

Fig.10: LBADH katalysierte asymmerische ($R^1 \neq R^2$) Reduktion mit Cofaktorregenerierung

Fig.11: LBADH katalysierte asymmerische Reduktion von Acetophenon zu Phenylethanol mit Cofaktorregenerierung

Fig.12: LBADH katalysierte asymmetrische Reduktion von 6-chloro-5,3-dioxohexanoat (2) zu (S)-6-chloro-5-hydroxy-3-oxohexanoat (3) mit Cofaktorregenerierung und im wäßrigen Puffer verlaufenden Nebenreaktion zu (4-Oxo-4,5-dihydrofuran-2-yl)-essigsäure tert-butyl ester (1).

Fig.13: Reaktion mit enzymgekoppelten Cofaktorregenerierungen unter Verwendung von NADPH-abhängiger Formiatdehydrogenase (FDH)

Das erfindungsgemäße Verfahren arbeitet mit einem Zweiphasensystem umfassend eine wässrige Phase, die eine Oxioreduktase mikrobieller Herkunft enthält und eine organische Phase, in der das Substrat gelöst ist, die miteinander in Kontakt gebracht werden. Zwischen der wässrigen Phase und der organischen Phase existiert eine scharfe Phasentrennung. Das Substrat hat einen Verteilungskoeffizienten für die Verteilung im organischen Lösungsmittel und in Wasser. Es kann in einem Bereich von beispielsweise organisches Lösungsmittel/Wasser 1:1 bis 1000/1 liegen. Vorzugsweise ist das Substrat gut oder sehr gut in der organischen Phase löslich und besitzt in der wässrigen Phase eine geringere Löslichkeit als in der organischen Phase. Bedingt durch dieses Verteilungsgleichgewicht gelangen Substratmoleküle in die wässrige Phase, in denen sich das Enzym befindet. In der wässrigen Phase wird das Substrat mit einer Geschwindigkeit zum Produkt umgesetzt, die von der Aktivität des Enzyms abhängig ist. Dabei kann die Geschwindigkeit durch eine Erhöhung der Enzymkonzentration erhöht werden. Über den Verteilungskoeffizienten des Substrates, das Volumenverhältnis Wasser/organische Phase und/oder durch die Wahl der Enzymaktivität bzw. der Enzymkonzentration kann ein Gleichgewicht hergestellt werden, in dem die stationäre Konzentration an Substrat in der wässrigen Lösung so gering wie möglich ist. Hierdurch werden Nebenreaktionen des Substrates beispielsweise mit Wasser, weitestgehend oder vollständig unterbunden. In einer weiterhin bevorzugten Ausführungsform ist das Reaktionsprodukt, beispielsweise der Alkohol, in der organischen Phase besser löslich als in der wässrigen Phase, so dass er der wässrigen Phase seinerseits entzogen wird. Der wässrigen Phase ist als Cofaktor beispielsweise NAD^+ oder NADP^+ zugesetzt.

Als Reaktionsenzym dient eine Oxidoreduktase mikrobieller Herkunft, beispielsweise eine Alkoholgehydrogenase wie z. B. die Alkoholdehydrogenase aus *Candida parapsylosis* oder *Lactobacillus kefir*, oder eine Carbonylreduktase. Besonders bevorzugt ist die Alkoholgehydrogenase als *Lactobacillus brevis* (LBADH). Im Allgemeinen können Enzyme der Enzymklasse 1 (Oxidoreduktasen) besonders die auf CH-OH Donorgruppen wirkende Oxidoreduktasen (EC 1.1), ganz besonders die mit NAD⁺ oder NADP⁺ als Akzeptor (E.C.1.1.1) oder Alkoholdehydrogenasen der EC 1.1.1.2 oder E.C. 1.1.1.1 verwendet werden.

Die Oxidoreduktasen werden vorzugsweise aus *E.coli* exprimiert.

Als organische Lösungsmittel kommen mindestens eine Komponente aus der Gruppe Ether, offenkettige Alkane, zyklische Alkane und aromatische Lösungsmittel oder mindestens einer Komponente aus dieser Gruppe in Betracht. Beispielfhaft können Methyltertiärbutylether (MTBE), Cyclohexan, Isohexan und Toluol, weiterhin Ether mit Resten R¹, R², einer Kettenlänge von C1 bis C7 oder bis C9, wobei jede Unterkombination sowie auch verzweigte Varianten möglich sind, genannt werden können. Beispielfhaft können Diisopropylether, Diethylether, Dibutylether, Butylethylether, Propylmethylether genannt werden. Vorzugsweise sind diese Lösungsmittel nicht mit Wasser mischbar bzw. nur in geringem Maße in Wasser löslich, das heißt, die Lösungsmittel bilden mit Wasser Mischungslücken.

Überraschenderweise sind die Oxidoreduktasen in Gegenwart von MTBE besonders stabil, so daß sie über mehrere hundert Stunden aktiv sind.

Die Aktivität der Oxidoreduktase liegt vorzugsweise in einem Bereich von 0,5 U bis 1000 U/ml und bleibt innerhalb eines Zeitraumes bis zu 500 Stunden weitgehend konstant. Ebenfalls hervorragende Ergebnisse werden jedoch
5 noch nach 800 bis 1000 Stunden beobachtet, wie aus Figur 9 zu entnehmen ist.

Vorzugsweise hat die wässrige Phase einen pH-Wert von 4,5 bis 9. Als Puffer können beispielsweise Kaliumphosphat,
10 Citrat, HEPES, tris-HCl, MES und weitere Puffer für diesen Bereich verwendet werden.

Als Substrat wird vorzugsweise ein Keton oder Aldehyd eingesetzt, daß vorzugsweise lipophil ist. Beispielhaft
15 können Acetophenon und Derivate, Benzophenon, Aceton, Methylpropylketon, Methylpentylketon und deren Derivate, Oxohexanoate, besonders die ω -Halogen-5-oxohexansäure-derivate, cyclische Ketone, besonders Cyclohexanon und Derivate, aromatische und aromatsubstituierten Ketone,
20 Diketone und deren Derivate, wie Hexadione und 3,5-Dioxohexansäure und deren Derivate sowie ω -Halogendioxohexansäure und deren Derivate, besonders 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure und deren Derivate, wie z. B. tert-Butyl-6-chloro-3,5-dioxohexanoat, weiterhin die Ester und Phenylpropandion und Derivate, beziehungsweise die Mono-
25 hydroxyderivate davon oder mindestens eine Komponente daraus eingesetzt werden.

Die Konzentration des Substrates in der organischen Phase richtet sich nach der Löslichkeit der Verbindung in der
30 organischen Phase und beträgt vorzugsweise 20 mM bis 1000 mM. Die Löslichkeit des Substrates ist jedoch in der wässrigen Phase vorzugsweise kleiner als 100 mmol/l. Besonders bevorzugt ist eine Ausführungsform bei der das

Substrat eine Löslichkeit von weniger als 40 mmol/l in der wässrigen Phase hat.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform befindet sich zwischen der wässrigen- und der organischen Phase eine mikroporöse Membran, welche die beiden Phasen trennt. Die mikroporöse Membran besitzt Poren, die für das Substrat und für das Reaktionsprodukt durchlässig sind und beispielsweise eine Größe von 300 μm haben.

Membranen einer Porengröße in dieser Größenordnung von 100 bis 500 oder 1000 μm ermöglichen überraschenderweise eine besonders schnelle und gut verlaufende Reaktion. Es können jedoch auch andere, sich im Handel befindliche Membranen, wie Mikro-, Nano-, oder Ultrafiltrationsmembranen eingesetzt werden.

Die wässrige Phase und die organische Phase fließt vorzugsweise entlang der Membran, wobei die Fließrichtung von organischem Lösungsmittel und Wasser vorzugsweise nach dem Gegenstromprinzip ausgerichtet sind, das heißt, dass die Fließrichtungen im wesentlichen in entgegengesetzter Richtung erfolgen. In einem derartigen System können die wässrige- und organische Phase in getrennten Kreisläufen geführt werden. Das aus dem Kreislauf austretende Wasser, welches den Cofaktor enthält, kann einer Station zugeführt werden, in welcher sich ein cofaktorregenerierendes Enzym befindet. Dieses Enzym kann mit dem Reaktionsenzym, der Oxidoreduktase, der wässrigen Phase identisch oder auch verschieden sein. Ist das Regenerierungsenzym vom Reaktionsenzym verschieden, so ist es praktikabel den aus dem Reaktionsraum austretenden Wasserstrom, welcher das Reaktionsenzym, die Oxidoreduktase, enthält, über einen Filter bzw. über eine Membran zu leiten, welche geeignet ist, die Oxidoreduktase zurückzuhal-

ten, so dass nur das Wasser mit dem Coenzym aus dem Reaktionsraum austritt und der Regenerierung zugeführt werden kann. Nach der Regenerierung kann der regenerierte Cofaktor der Reaktionslösung in einem Kreislauf wieder zugeführt werden, wobei die Rückhaltung des regenerierenden Enzyms möglich ist.

Ist das Regenerierungsenzym von der Oxidoreduktase im Reaktionsraum verschieden, so können als Regenerierungsenzyme beispielsweise Formiatdehydrogenase (FDH), Hydrogenase, eine andere ADH, z.B. GDH (Gluceron-Dehydrogenase), Glc-6-P DH oder Pferdeleberdehydrogenase eingesetzt werden. Hierdurch kann auch die Regenerierungsgeschwindigkeit des Cofaktors von der Leistungsfähigkeit des Reaktionssenzym entkoppelt werden. Ist die Regenerierung des Coenzym in der Reaktionslösung die langsamste Reaktion, so kann durch die Regenerierung mit einem anderen Enzym im Regenerierungskreislauf eine Beschleunigung der Reaktion und damit eine Verkürzung der Produktionszeit erreicht werden.

Ist das Produktionsemzym und das Regenerationsemzym identisch, so kann der selbe Effekt durch unterschiedliche Verweilzeiten bzw. Reaktionszeiten oder unterschiedliche Reaktionsbedingungen für den Produktionsprozess und Regenerierstrom erreicht werden. Diese unterschiedlichen Reaktionsbedingungen für den Produktions- und Regenerierungsprozess können zum Beispiel unterschiedliche pH-Werte, verschiedene Enzymkonzentrationen oder eine unterschiedliche Temperatur sowie verschiedene Konzentrationen von Co-Substrat und Co-Produkt sein. Durch die auf diese Weise erhöhte Reaktionsgeschwindigkeit in der Reaktionslösung wird eine niedrigere Konzentration an Substrat in der wässrigen Lösung erreicht, da das Substrat schneller

aus dem Gleichgewicht entzogen wird. Eine Folge davon ist auch, daß Nebenreaktionen des Substrats beispielsweise in der wässrigen Lösung unterbunden werden, was eine höhere Reinheit des Produkts zur Folge hat. Durch Verringerung der Reaktionsdauer durch die Entkopplung der Regenerierungsgeschwindigkeit von der Enzymgeschwindigkeit der Reaktionslösung kann wiederum die Kontaktzeit zwischen der wässrigen- und organischen Phase vermindert werden.

Wie die wässrige Phase so kann auch die organische Phase mit dem Substrat in einen Kreislauf geführt werden. In diesen Kreislauf tritt das organische Lösungsmittel, welches noch Substrat beinhaltet und das bereits mit Produkt angereichert ist, welches aus dem Prozess entfernt werden soll aus dem Kontaktbereich aus und wird einer Trennstation zugeführt, aus der das Produkt selektiv entfernt wird. Das Lösungsmittel, das bereits vom Produkt entfernt ist und das gegebenenfalls noch Substratreste enthält wird in einem Kreislauf wieder in die Reaktionszone zugeführt, wobei zusätzlich Substrat eingespeist werden kann. Werden die wässrige- und die organische Phase in einem Gegenstromprinzip geführt, so kann sich an der Austrittsstelle des organischen Lösungsmittels kein Substrat mehr befinden. In diesem Fall wird lediglich das Produkt entfernt, dem Lösungsmittel neues Substrat zugegeben und die neue Substratlösung wieder in den Prozess eingespeist.

Erfindungsgemäß wird ein Zweiphasensystem bereitgestellt, mit dem ein Herstellungsverfahren zur Produktion von Alkoholen betrieben werden kann, welches eine Prozessführung ermöglicht, bei der die Oxidoreduktase über sehr lange Zeiträume nicht in ihrer Aktivität gemindert wird. Das erfindungsgemäße Zweiphasensystem umfasst eine wässrige Phase in dem die Oxidoreduktase mikrobieller Her-

kunft gelöst ist sowie eine organische Phase, welche mit der wässrigen Phase in Kontakt steht und die eine scharfe Phasengrenze zur wässrigen Phase ausbildet. Es kann als fertiges Agens für die Reduktion von Ketonen und Aldehyden eingesetzt werden. Vorzugsweise sollte die organische Phase wenig oder gar nicht in der wässrigen Phase löslich sein und idealerweise eine Mischungslücke ausbilden.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es möglich enantioselektive Synthesen auf effektive Weise durchzuführen.

Die in Figur 1 dargestellte erfindungsgemäße Vorrichtung umfasst einen Reaktor 1, welcher Membranen 2 besitzt, die verschiedene Räume 3a/b trennen. Der Vorrichtung ist ein Substratvorratsbehälter 4 zugehörig, von dem eine Leitung 5 ausgeht, die auf der Seite A in den Reaktor 1 mündet. Die Leitung 5 läuft über eine Pumpe 6. An der gegenüberliegenden Seite verlässt eine Leitung 7, den Reaktor 1 und mündet in den Substratvorratsbehälter 4. Analog ist dem Reaktor 1 ein weiterer Behälter 8 zugeordnet, welcher über eine Leitung 9, die über eine Pumpe 10 läuft, der mit Seite B des Reaktors 1 in Verbindung steht. An der Seite B tritt eine Leitung 11 aus dem Reaktor 1 aus, die in den Behälter 8 mündet. Die Leitungen 5 und 9 sind so angeordnet, dass sie im Reaktor 1 verschiedene, durch die Membran 2 getrennte Zonen versorgen.

Vorzugsweise handelt es sich bei der Membran um eine Polypropylenmembran, mit einer Porengröße von ca. 300µm. Die erfindungsgemäße Vorrichtung ist dadurch gekennzeichnet, dass sie über den zweiten Behälter 8 verfügt, welcher eine entkoppelte Regenerierung des Cofaktors ermöglicht.

Beispiele:

Beispiel 1 (Fig.2)

LBADH-katalysierte enantioselektive Reduktion von Acetophenon zu (R)-Phenylethanol:

Die LBADH-katalysierte von Acetophenon zu Phenylethanol wurde im Zweiphasensystem Wasser/MTBE (1:1 v/v) durchgeführt. Die Enantioselektivität der Reaktion blieb dabei wie in einem einphasigen System.

Figur 2 zeigt den Verlauf der LBADH-katalysierten enantioselektiven Reduktion von Acetophenon zu (R)-Phenylethanol unter den Bedingungen 10mM Acetophenon; 200 mM 2-Propanol; 0,2 mM NADP; 4U/mL Enzym, 5mL Puffer- 150mM Kaliumphosphat, pH 7,0; 5 mL MTBE.

Ordinate y: Restkonzentration bzw. Umsatz auf 1 normiert
Abszisse x: Zeit (min)

Beispiel 2:

LBADH-katalysierte enantioselektive Reduktion von tert.-Butyl-6-chloro-3,5-dioxohexanoat zu tert-Butyl (S)-6-Chloro-3,5-dioxohexanoat:

5

Die LBADH-katalysierte Reduktion von tert-Butyl (S)-6-Chloro-3,5-dioxohexanoat zu tert-Butyl (S)-6-Chloro-5-Hydroxy-3-Oxohexanoat wurde im Zweiphasensystem Wasser/MTBE (1:1 v/v) durchgeführt. Dabei wirkt die organische Phase als Substratreservoir und gleichzeitig als Regelung für die wäßrige Substratkonzentration, die dadurch niedrig gehalten wird. Diese Methode wird benutzt, um die spontane Zersetzung des Substrates zu vermeiden.

10

15

Figur 3 zeigt den Verlauf der LBADH-katalysierten Reduktion zu tert-Butyl (S)-6-Chloro-5-hydroxy-3-oxohexanoat

unter den Bedingungen 20 mM Substrat; 1,5 M 2-Propanol;
1,0 mM NADP; 30 U/mL Enzym, 15 mL Puffer - 150 mM Kalium-
phosphat, pH 7,0; 15 mL MTBE.

Hierin bedeuten

- 5 die Abszisse x: Zeit (Stunden)
Die Ordinate y: Konzentration mM

Beispiel 3:

- 10 Repetitiver Batch der *LBADH*-katalysierten enantioselekti-
ven Reduktion von Acetophenon in einem Zweiphasensystem.

- 15 Die *LBADH*-katalysierte Reduktion von Acetophenon zu Phe-
nylethanol wird im Zweiphasensystem Wasser/MTBE (1:1 v/v)
durchgeführt. Durch Erneuerung der organischen Phase (Lö-
sungsmittel, Substrat und Produkt gegen Lösungsmittel und
Substrat) nach Erreichen des erwünschten Umsatzes wird
die Wiederverwendung von Katalysator und Cofaktor er-
zielt.

- 20 Figur 4 zeigt den Verlauf der *LBADH*-katalysierten enanti-
oselektiven Reduktion von Acetophenon zu (*R*)-Phenyl-
ethanol im repetitiven Modus unter den Bedingungen 10 mM
Acetophenon; 1,5 M 2-Propanol; 4,0 mM NADP; 100 U/mL En-
zym, 2,5 mL Puffer - 150 mM Kaliumphosphat, pH 7,0;
25 2,5 mL MTBE.
Es zeigt die Ordinate y: Umsatz auf 1 normiert
Die Abszisse x: Zeit (Stunden)

Beispiel 4:

- 30 Repetitive Batch der *LBADH*-katalysierten enantioselekti-
ven Reduktion von *tert*-Butyl (*S*)-6-Chloro-3,5- dioxohexa-
noat.

Analog Beispiel 3 wird die Ausnutzung des Katalysators und Cofaktors durch Erneuerung der organischen Phase (Lösungsmittel, Substrat, Produkt und Nebenprodukt gegen Lösungsmittel und Substrat) nach Erreichen des erwünschten Umsatzes erhöht.

Figur 5 zeigt den Verlauf der *LBADH*-katalysierten enantioselektiven Reduktion von *tert*-Butyl (*S*)-6-Chloro-3,5-dioxohexanoat im repetitiven Modus unter den Bedingungen 20 mM Substrat; 1,5 M 2-Propanol; 1,0 mM NADP; 30 U/mL Enzym, 15 mL Puffer - 150 mM Kaliumphosphat, pH 7,0; 15 mL MTBE.

Es zeigt:

Die Ordinate y: Konzentration (mM)
Die Abszisse x: Zeit (Stunden)

Beispiel 5: *LBADH*-katalysierte enantioselektive Reduktion von Acetophenon im Phasenkontaktor.

Die *LBADH*-katalysierte Reduktion von Acetophenon zu Phenylethanol wird im Zweiphasensystem Wasser/MTBE (1:1 v/v) durchgeführt. Zur Stabilisierung der Phasengrenzen mit definierter Fläche wird ein Phasenkontaktor (Minimodul 0,75 X 5 Liqui-Cel G 477 der Firma Celgrad Inc.) verwendet. Der Verteilungskoeffizient wird schnell durch Hin- und Rückdiffusion erreicht.

Figur 6 zeigt den Verlauf der *LBADH*-katalysierten enantioselektiven Reduktion von Acetophenon zu (*R*)-Phenylethanol im Phasenkontaktor unter den Bedingungen 10 mM Acetophenon; 3,0 mM NADP; 30 U/mL Enzym, 50 mL Puffer -

150 mM Kaliumphosphat, pH 7,0; 50 mL MTBE. Hierin bedeuten:

Die Ordinate y: Umsatz von Substrat auf 1 normiert

Die Abszisse x: Zeit (min)

5

Beispiel 6:

LBADH-katalysierte enantioselektive Reduktion von tert-Butyl (S)-6-chloro-3,5-dioxohexanoat im Phasenkontaktor.

10

Die LBADH-katalysierte Reduktion von tert-Butyl (S)-6-chloro-3,5-dioxohexanoat zu tert-Butyl (S)-6-Chloro-5-hydroxy-3-oxohexanoat wurde in dem in Abb. 1 dargestellten Reaktor durchgeführt. Dabei fungiert die organische Phase als Substratreservoir und gleichzeitig als Regelung für die wäßrige Substratkonzentration, die dadurch niedrig gehalten wird. Diese Methode wird benutzt um die spontane Zersetzung des Substrates zu vermindern.

15

20

Figur 7 zeigt : Verlauf der LBADH-katalysierte enantioselektive Reduktion zu tert-Butyl (S)-6-Chloro-5-hydroxy-3-oxohexanoat im Phasenkontaktor unter den Bedingungen 20 mM Substrat; 1,5 M 2-Propanol; 1,0 mM NADP; 30 U/mL Enzym, 50 mL Puffer - 150 mM Kaliumphosphat, pH 7,0; 50 mL MTBE.

25

Es zeigt :

Die Ordinate y: Konzentration mM

Die Abszisse x: Zeit (Stunden)

Cofaktorregenerierung gemäß Fig.8:

30

Die Cofaktorregenerierung wird in der wäßrigen Phase durchgeführt. Damit am Zulauf der organischen Phase im Phasenkontaktors eine ausreichende Cofaktorkonzentration

vorhanden ist, wird ein Rührkessel integriert. Dies ermöglicht eine konstante Selektivität über den gesamten Umsatz.

Figur 8 zeigt die Selektivität als Funktion des Umsatzes bei der LBADH-katalysierten Reduktion zu tert-Butyl (S)-6-Chloro-5-hydroxy-3-oxohexanoat im Phasenkontaktor.

Es bedeuten:

Ordinate y: Selektivität der Produktbildung auf 1 normiert

Abszisse x: Umsatz auf 1 normiert.

Beispiel 7:

Stabilität der LBADH im MTBE/Wasser Zweiphasensystem:

Figur 9 zeigt einen Graphen, in dem die Lagerstabilität der LBADH im 1:1 MTBE/Puffer System mit 50mM Kaliumphosphat, pH 7,0 bei 4°C abgebildet ist.

Es zeigt:

Die Abszisse x: Zeit (Stunden)

Die Ordinate y: Die Restaktivität auf 1 normiert.

Beispiel 8:

Figur 13 zeigt den Verlauf der LBADH-katalysierten Reduktion zu tert-Butyl (S)-6-Chloro-5-hydroxy-3-oxohexanoat mit enzymgekoppelten Cofaktorregenerierung (20 mM Substrat; 200 mM Formiat; 1,0 mM NADP; 20 U/mL LBADH, 6,6 U/mL FDH (für die Cofaktorregenerierung), 15 mL Puffer - 150 mM Kaliumphosphat, pH 5,5; 15 mL MTBE). In ihr sind:

Die Abszisse x: Zeit (Stunden)

Die Ordinate y: Konzentration mM

Die Ordinate y': Selektivität der Produktbildung auf 1 normiert.

P a t e n t a n s p r ü c h e

-
1. Verfahren zur Herstellung von Alkoholen aus Substraten mittels Oxidoreduktasen, dadurch gekennzeichnet, dass eine Oxidoreduktase mikrobieller Herkunft in wässriger Lösung und das Substrat in einer organischen Lösung vorgelegt werden und dass die wässrige Phase und die organische Phase in einem Zweiphasensystem miteinander in Kontakt gebracht werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Oxidoreduktase der Enzymklasse 1 (EC1), eine auf CH-OH-Donorgruppen wirkende Oxidoreduktase (EC 1.1), mit NAD^+ oder NADP^+ als Akzeptor geeignete Oxidoreduktase (EC 1.1.1), eine ADH EC 1.1.1.1 und EC 1.1.1.2 oder eine Carbonylreduktase, ist.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus kefir* oder *Candida paraspylosis* abstammt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Oxidoreduktase rekombinant aus *E.coli* exprimiert ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet,

dass das organische Lösungsmittel mindestens eine Komponente aus der Gruppe von Ethern, offenkettige Alkane, cyclische Alkane und aromatische Lösungsmittel ist.

- 5
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das organische Lösungsmittel mindestens eine Komponente aus der Gruppe von Methyltertiärbutylethan, Cyclohexan, Isohexan, Ether mit Resten R¹ und R und Toluol ist.
- 10
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration / Aktivität der Oxidoreduktase in der wässrigen Phase mindestens 0,5 U/ml ist.
- 15
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Anfangskonzentration des Substrates in der mit Wasser nicht mischbaren organischen Phase mindestens 10 mM ist.
- 20
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Substrat ein Keton oder ein Aldehyd ist.
- 25
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass als Keton mindestens eine Komponente aus der Gruppe Acetophenon, Benzophenon, Aceton, α -Halogenhexansäureester, Oxobenzoat, Methylpropylketon, Methylpentylketon und deren Derivate, Oxohexanoate, ω -Halogen-5-oxohexansäurederivate, cyclische Ketone,
- 30

Cyclohexanon und Derivate, aromatische und aromatsubstituierte Ketone, Diketone und deren Derivate, wie Hexadione und 3,5-Dioxohexansäure und deren Derivate, sowie ω -Halogendioxohexansäure und deren Derivate, wie 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure und deren Derivate, wie *tert.*-Butyl-6-Chloro-3,5-dioxohexanoat, Ester und Phenylpropandion und deren Derivate, beziehungsweise deren Monohydroxyderivate eingesetzt wird.

- 10 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10,
dadurch gekennzeichnet,
dass die wässrige Phase einen pH-Wert in einem Bereich von 4,5 bis 9 hat.
- 15 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
dass der wässrigen Phase ein Cofaktor zugesetzt wird.
- 20 13. Verfahren nach Anspruch 12,
dadurch gekennzeichnet,
dass als Cofaktor NAD^+ oder NADP^+ eingesetzt wird.
- 25 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13,
dadurch gekennzeichnet,
dass ein Substrat eingesetzt wird, dessen Löslichkeit in der wässrigen Phase kleiner 100 mmol/l ist.
- 30 15. Verfahren nach Anspruch 14,
dadurch gekennzeichnet,
dass ein Substrat eingesetzt wird, dessen Löslichkeit in der wässrigen Phase kleiner 40 mmol/l ist.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Phasengrenzfläche zwischen der wässrigen und
der organischen Phase durch eine mikroporöse Membran
getrennt ist.
17. Verfahren nach Anspruch 16,
dadurch gekennzeichnet,
dass eine mikroporöse Membran mit Poren einer Größe
von 100 μm bis 1000 μm eingesetzt wird.
18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17,
dadurch gekennzeichnet,
dass das organische Lösungsmittel mit dem Substrat in
einem Kreislauf über der mikroporösen Membran geführt
wird.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 18,
dadurch gekennzeichnet,
dass die wässrige Lösung mit der Oxidoreduktase in
einem Kreislauf über der mikroporösen Membran geführt
wird.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 19,
dadurch gekennzeichnet,
dass das organische Lösungsmittel mit dem Substrat
und die wässrige Phase mit der Oxidoreduktase in ge-
genläufiger Richtung über die Membran geleitet wer-
den.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 20,
dadurch gekennzeichnet,
dass die wässrige Phase mit dem Cofaktor in einem
Kreislauf geführt wird, bei dem der Cofaktor haupt-

sächlich außerhalb des Reaktionsraumes regeneriert wird.

- 5 22. Verfahren nach Anspruch 21,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Cofaktor mit dem selben Enzym regeneriert wird.
- 10 23. Verfahren nach Anspruch 22,
dadurch gekennzeichnet,
dass bei der Regenerierung mindestens ein experimen-
teller Parameter gegenüber dem Produktionsprozess
verändert ist.
- 15 24. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 21,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Cofaktorregenerierung mit einem anderen En-
zym durchgeführt wird als die Umsetzung in der wäss-
rigen Phase, die mit der organischen Phase in Kontakt
20 steht.
- 25 25. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 21 und 24,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Enzym nach Anspruch 21 befähigt ist, den Co-
faktor effektiver zu regenerieren als die Oxidoreduk-
tase in der wässrigen Phase, die mit der organischen
Phase in Kontakt steht.
- 30 26. Verfahren nach Anspruch 25,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Enzym nach Anspruch 21 eine Formiatdehadro-
gemase (FDH), eine Hydrogenase, eine andere ADH, GDH
(Gluceronl-Dehydrogenase), Glc-6-P DH oder

Pferdeleberdehydrogenase ist.

27. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 26,
dadurch gekennzeichnet,
dass die organische Phase mit dem Substrat in einem
Kreislauf geführt wird, bei dem Produkt abgetrennt
und neues Substrat eingespeist wird.
28. Zweiphasensystem umfassend eine wässrige Phase und
eine organische Phase,
dadurch gekennzeichnet,
dass die organische Phase mit der wässrigen Phase
eine Mischungslücke bildet und daß die wässrige Phase
eine Oxidoreduktase mikrobieller Herkunft enthält.
29. Zweiphasensystem nach Anspruch 28,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Oxidoreduktase eine Alkoholdehydrogenase,
eine Oxidoreduktase der Enzymklasse 1 (EC1), eine auf
CH-OH-Donorgruppen wirkende Oxidoreduktase EC 1.1,
mit NAD⁺ oder NADP⁺ als Akzeptor geeignete Oxidoreduk-
tase EC 1.1.1, eine ADH EC 1.1.1.1 und EC 1.1.1.2
oder eine Carbonylreduktase, ist.
30. Zweiphasensystem nach Anspruch 29,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Alkoholdehydrogenase die Alkoholdehydrogena-
se aus *Lactobacillus brevis* aus *Lactobacillus kefir*
oder *Candida parapsylosis* ist
31. Zweiphasensystem nach einem der Ansprüche 28 bis 30,
dadurch gekennzeichnet,
dass das organische Lösungsmittel mindestens eine
Komponente aus der Gruppe Ethern, offenkettige Alka-

ne, cyclische Alkane und aromatische Lösungsmittel ist.

- 5 32. Zweiphasensystem nach Anspruch 28 bis 31,
dadurch gekennzeichnet,
dass das organische Lösungsmittel mindestens eine
Komponente aus der Gruppe von Methyltertiärbutyl-
ethan, Cyclohexan, Isohexan und Toluol ist.
- 10 33. Vorrichtung, umfassend einen Reaktor (1), der durch
eine Membran (2) in mindestens zwei Räume 3a,3b, auf-
geteilt ist und bei dem ein Raum (3b) über Leitungen
(5,7) und einer Pumpe (6) mit einem Substratvorrats-
behälter (4) in Verbindung steht,
15 dadurch gekennzeichnet,
dass der Raum (3a) über Leitungen (9,11) über eine
Pumpe (10) mit einem weiteren Behälter (8) in Verbin-
dung steht.
- 20 34. Vorrichtung nach Anspruch 33,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Membran eine mikroporöse Membran ist.
- 25 35. Vorrichtung nach Anspruch 34,
dadurch gekennzeichnet,
dass die mikroporöse Membran eine Porengröße von 100
 μm bis 1000 μm besitzt.

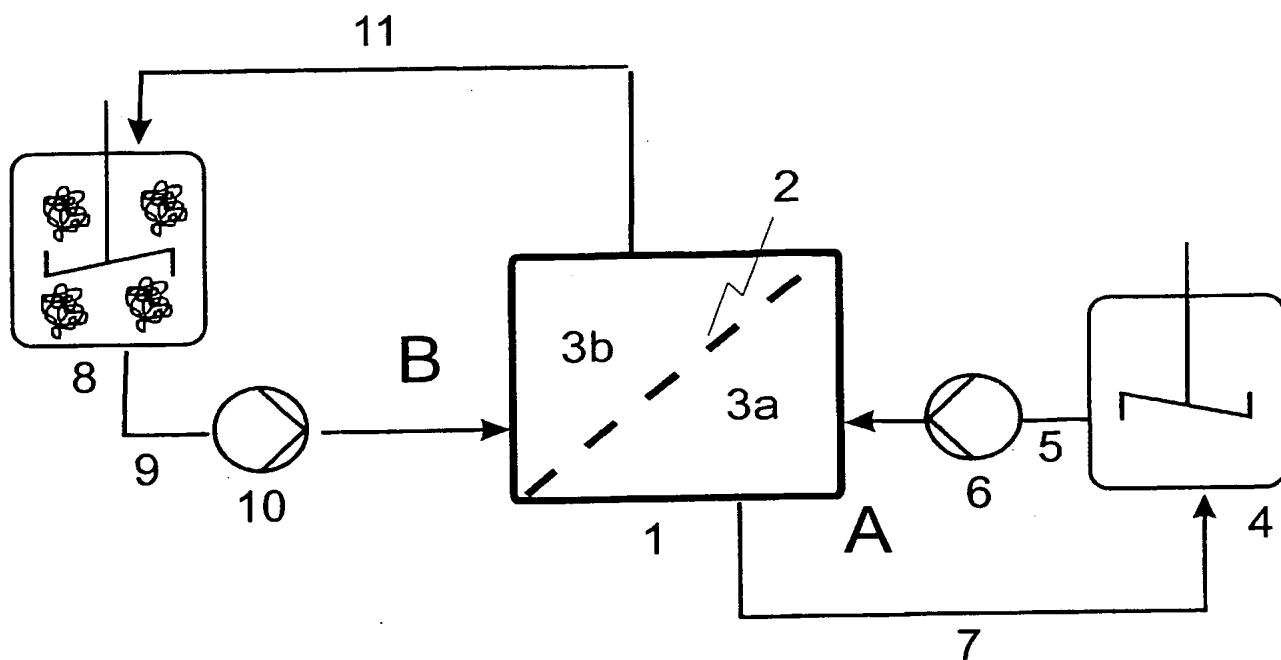


Fig. 1

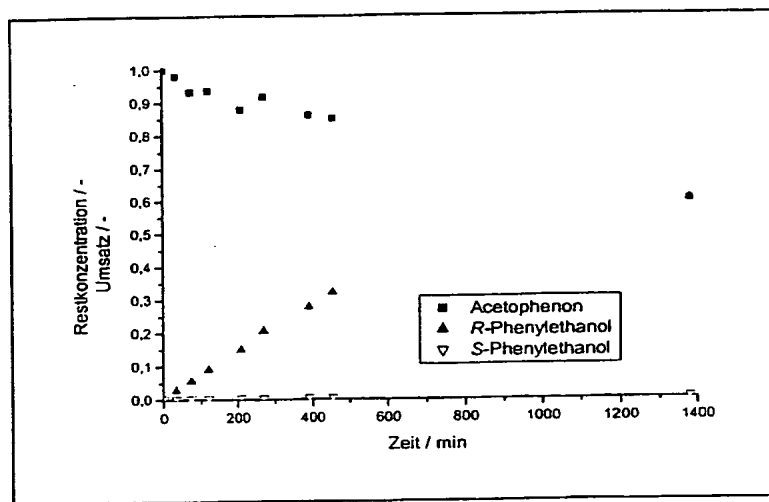


Fig. 2

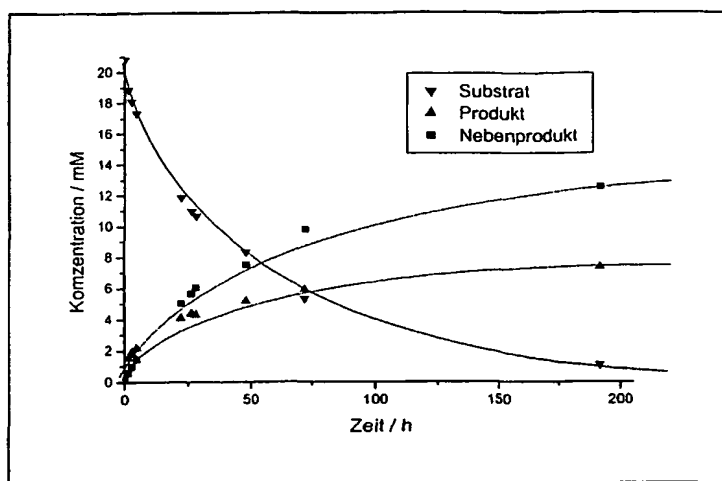


Fig. 3

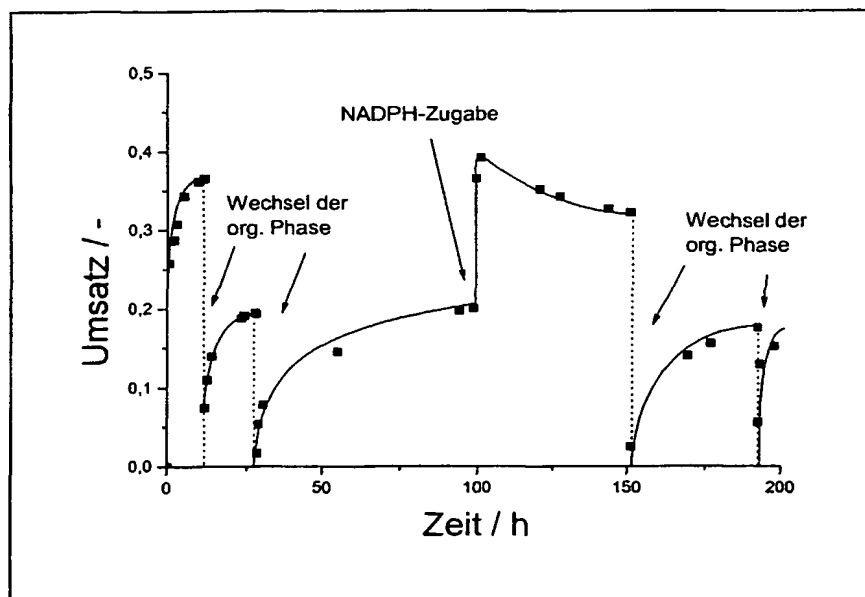


Fig. 4

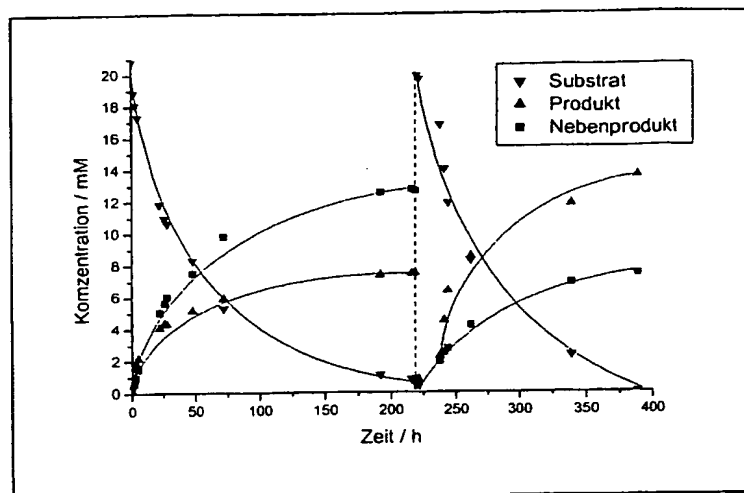


Fig. 5

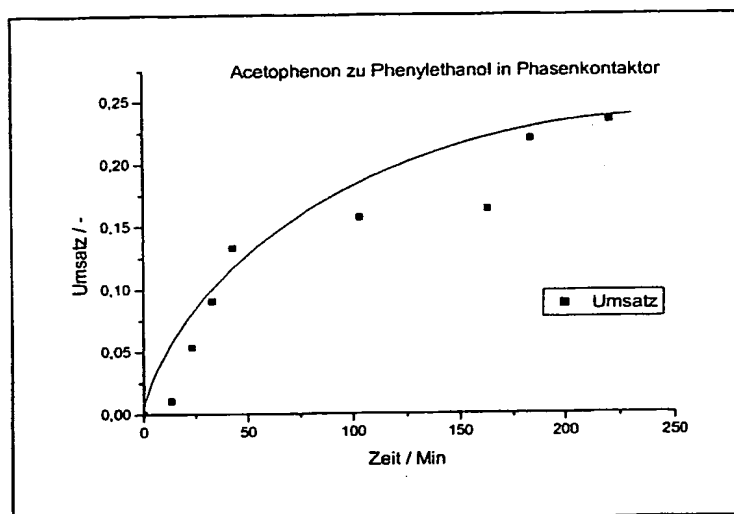


Fig. 6

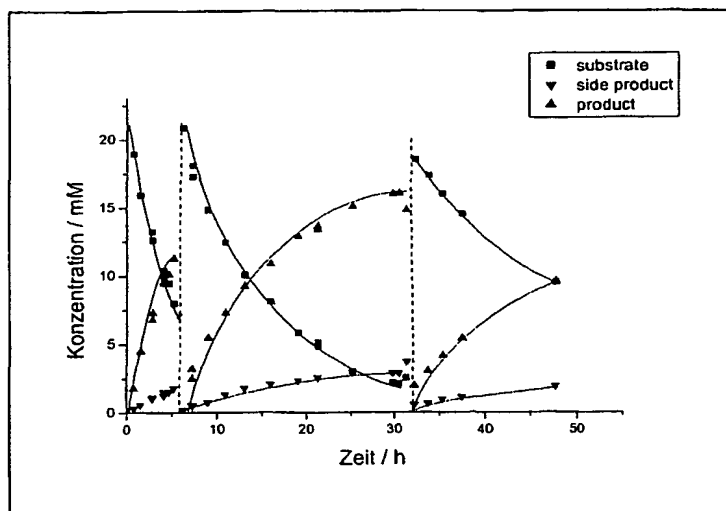


Fig. 7

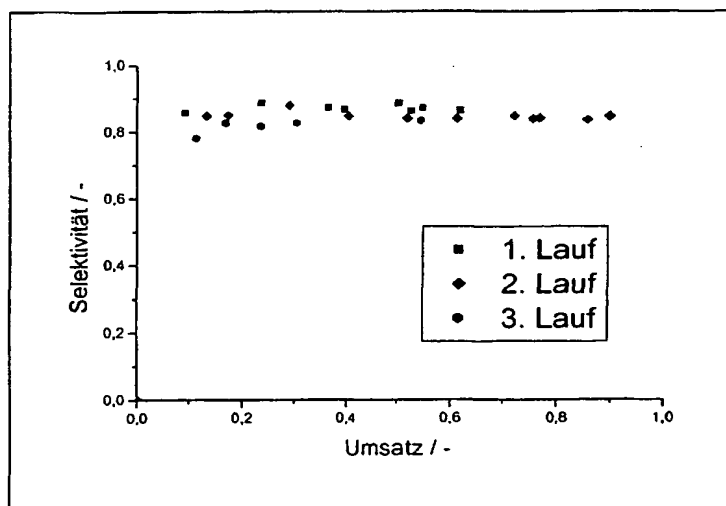


Fig. 8

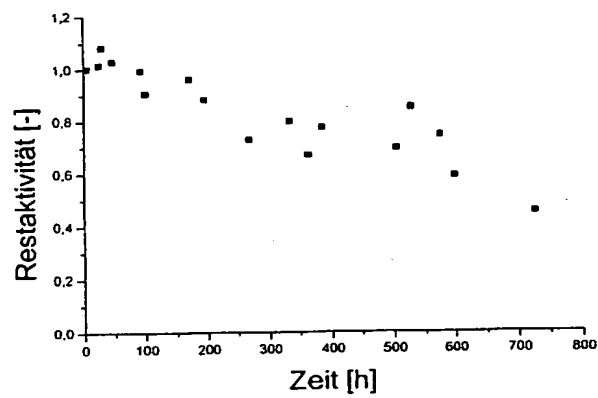


Fig. 9

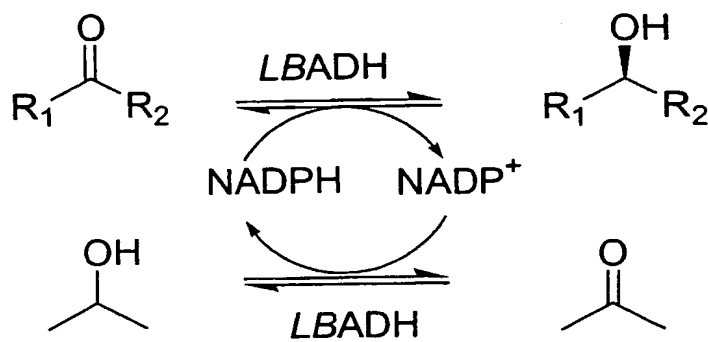


Fig. 10

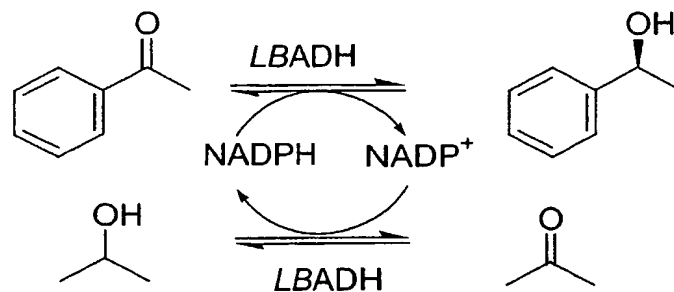


Fig: 11

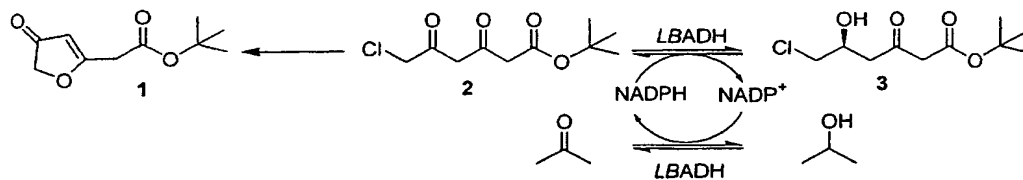


Fig. 12

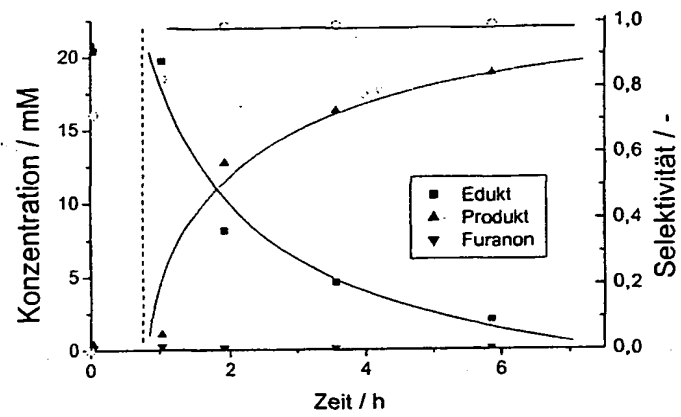


Fig. 13

This Page Blank (uspto)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

This Page Blank (L)